

大腸菌における β -galactosidase 合成の調節

(非 cyclic AMP 系 catabolite repression の存在について)

金沢大学医学部第二生化学講座 (主任: 久野滋教授)

山 川 文 徳

(昭和56年1月10日受付)

Key words β -galactosidase, catabolite repression, cyclic AMP.

微生物において、 β -galactosidase に代表される誘導酵素の合成は種々の栄養源の有無により影響され、glucose を炭素源に用いると強い合成抑制が見られる。この現象は Monod により指摘され¹⁾、後に Magasanik により catabolite repression と命名された²⁾。

Catabolite repression は cyclic AMP (cAMP) と、その受容体である cyclic AMP receptor protein (CRP) により調節されていると言われ、このモデルによれば細胞内での cAMP 濃度が catabolite repression の程度を規定することになる。事実、glucose を炭素源とした時に現れる catabolite repression は細胞内の cAMP 濃度の低下を伴い、かつ cAMP 添加で解除される事が知られている³⁾。また *in vitro* での高い酵素誘導率は cAMP と CRP の共存下で可能となり⁴⁾、酵素誘導に cAMP と CRP の関与している事には疑いはない。しかしながら、種々の培養条件下での菌体内 cAMP の濃度、または cAMP 合成速度には報告者によってかなりの相違があり⁵⁾、更に cAMP と関連させる事の出来ない repression の存在が指摘され^{6)~8)}、cAMP - CRP 系を唯一の catabolite repression の原因とする事に疑いが持たれて来た。また glucose による catabolite repression は嫌氣的条件下で起らないと言われているが⁹⁾¹⁰⁾、その機構については不明な点が多く、cAMP - CRP との関連においても未解決のままである。

本研究では、この様な未解決な問題の解明、さらには酵素誘導機構の探求を目的として、広範囲な増殖条件下での酵素誘導の程度を測定すると同時に、増殖条

件の cAMP 合成能及び酵素誘導に及ぼす影響を比較検討した。

材料及び方法

1. 試薬.

各種炭素源、o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) は和光純薬工業株式会社、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)、 α -methyl-D-glucoside (α MG)、cAMP は Sigma Chemical Co., セルロースは Marchery Nagel Corp., adenine は Boehringer Mannheim Corp., [2-³H] adenine (20ci/mole), [8-³H]cAMP (30ci/mole) は RCC Amersham からそれぞれ購入した。

2. Strain 及び培地.

菌には大腸菌 3000 (thiamine⁻) の UV 照射から分離された adenine 要求菌を用いた¹¹⁾。培地には、Tris-amino acid 培地 (TA 培地)¹²⁾ に adenine (10 μ g/ml) と thiamine (2 μ g/ml) を加えたものを準備し、これにそれぞれ独立に準備した各種炭素源を目的に応じて添加し、最終濃度を 20mM とした。

3. 好氣的及び嫌氣的条件下での菌の増殖.

好氣的条件下での菌の増殖に対しては、菌を浮遊させた 6 ml の培地を L 型 tube に入れて、37℃ で振盪し、嫌氣的条件下の場合は、菌を浮遊させた 8 ml の培地を試験管 (30 ml) に入れて液面を約 2 ml の流動パラフィンで覆い、37℃ で静置した。増殖の程度は Baush-Lomb Spectronic 20 Photometer により波長 660nm での吸光度増加で測定した。増殖速度は分裂時

Control of β -Galactosidase Synthesis in *Escherichia coli* (Evidence for the Presence of Cyclic AMP-Independent Catabolite Repression). Ayanori Yamakawa, Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan.

間の逆数 (1/hr) で表示した。

4. β -galactosidase の誘導.

対数増殖期の菌を遠心 (8000 \times g, 3 分) により集菌し, 同一培地に約 2×10^8 cells/ml の濃度になる様に再浮遊させた. 約 15 分間, 好氣的及び嫌氣的条件に応じて 37 $^{\circ}$ C で振盪または静置させた後 IPTG (最終濃度 0.4mM) を添加して, β -galactosidase の誘導を開始した。

5. β -galactosidase の測定.

β -galactosidase の測定は Pardee¹³⁾ らとほぼ同様な方法で行なった. IPTG 添加後, 時間経過とともに 0.25 ml の標品を取り, 1 滴のトルエンとともに攪拌後 37 $^{\circ}$ C で 30 分間静置させた. このトルエン処理標品 50 μ l に 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かした 2.6mM ONPG を 0.9 ml 加え 15 分間 37 $^{\circ}$ C で反応させた. 0.4M 炭酸ナトリウム 2 ml を加えて反応を止めた後 Hitachi Perkin Elmer Spectrophotometer 139 にて 420nm で吸光度を測定した. 菌による濁度の補正は 550nm の吸光度から計算した¹³⁾. 酵素の 1 unit は 37 $^{\circ}$ C, pH 7.0 で 1 分間に 1 μ mole の ONPG を分解する量に対応する。

酵素合成の differential rate (Q) は $Q = 100 \{ (\text{units}/\text{OD}_{600})_{t_1} - (\text{units}/\text{OD}_{600})_{t_2} \} / (t_1 - t_2)$ で表わした。

6. cAMP 合成の測定.

cAMP 合成の測定は浜井¹¹⁾の方法にほぼ従い, ^3H -adenine より生じた ^3H -cAMP を測定した. 本菌は合成 cAMP の大半を培地中に放出し, cAMP 合成における変化は培地中の cAMP 濃度の変化に反映される為¹¹⁾, 培地中の放出 cAMP 量を測定した。

対数増殖期の菌を 40 nmole/ml ^3H -adenine (specific activity 6.7×10^5 dpm/nmole) を含む TA 培地 (2 μ g thiamine/ml, 20mM の炭素源含有) に浮遊した (菌の濃度; 約 2×10^8 cells/ml). 時間経過とともに 1.0 ml の標品をメンブレンフィルター (Sartorius 社) で濾過し 5 ml の TA 培地で洗浄した. この濾液と洗液を Dowex-1-column ($\times 8, 1 \times 2$ cm, acetate form) に通し, 20 ml の H_2O と 40 ml の 0.1M ammonium acetate (pH 4.5) で洗浄した後 cAMP を 5M acetic acid 15 ml で溶出させた. 溶出液を室温, 減圧下で乾燥させた後, 2.3 μ mole/ml cAMP 溶液 25 μ l に溶解し, その 5 μ l を一次元薄層クロマト (セルロース) に spot して 1M ammonium acetate : ethylalcohol (2:7) の溶媒で展開した. UV ランプで確認できる cAMP 部位を削り取り, 0.5N NH_4OH 0.5 ml, Triton-toluene scintillation 液 5 ml を加えて放射活性を測定した。

cAMP の合成速度 (V_c) は $V_c = \Delta C/T \cdot \Delta \text{OD}_{600}$ で表わした. ここで T は菌の分裂に要する時間 (min), C は cAMP の濃度 (mole/ml) を示す。

成 績

1. 好氣的及び嫌氣的条件下における

β -galactosidase の誘導.

図 1 は xylose を炭素源として好氣的または嫌氣的条件下で IPTG により β -galactosidase を誘導した時の時間経過を示す. 誘導開始後 10 または 15 分に glucose を添加すると, 好氣的条件では既知の如く約 15 分間の強い誘導抑制 (transient repression) に続き, 少し程度の弱い permanent repression が見られる. transient repression のみを起すと知られている α -methyl-D-glucoside (α MG) の¹⁴⁾添加では予想通り transient repression は見られるが, permanent repression は全く見られない. これに対して嫌氣的条件では glucose 添加は全く repression を起さず, むしろ酵素合成速度の増大を示した. この嫌氣的条件下でも α MG による transient repression は見られる。

好氣的または嫌氣的条件での酵素誘導の差を更に詳細に検討する為, 種々の炭素源を用いて, 増殖速度を変化させた条件で酵素誘導能を調べた. 図 2A は好氣的, B は嫌氣的条件下での β -galactosidase の誘導を示す. 何れもそれぞれの炭素源を用いて培養を行い, 0 分時に IPTG を添加した. 好氣的条件では glycerol, mannose 等を炭素源とした場合に誘導能が高く glucose, arabinose, mannitol 等では低い. これに対し嫌氣的条件では逆に glucose, mannitol 等で最大で, glycerol 等は低い. この他 pyruvate や succinate は glycerol とほぼ同じ様な効果を示した. glycerol や pyruvate 等を唯一の炭素源とした場合, 嫌氣的条件下での増殖はわずかであり, 誘導能の低値は栄養源不足によると思われる。

2. β -galactosidase 合成速度と増殖速度の関係.

上記の β -galactosidase 誘導能と増殖速度の関係をみると, 好氣的条件では一般に増殖速度の低いもの程誘導能が高く, 嫌氣的条件では逆に増殖速度の高いもの程誘導能が高い傾向が見られる. この関係を図示したのが図 3 である. 図で明らかな様に, 増殖速度 0.75 前後で β -galactosidase 合成速度が最大となり, これより低いまたは高い増殖速度では, それぞれ増殖速度に比例または反比例して β -galactosidase 合成速度が低下する。

図 3 において, 増殖速度 0.75 以下の大部分は嫌氣的

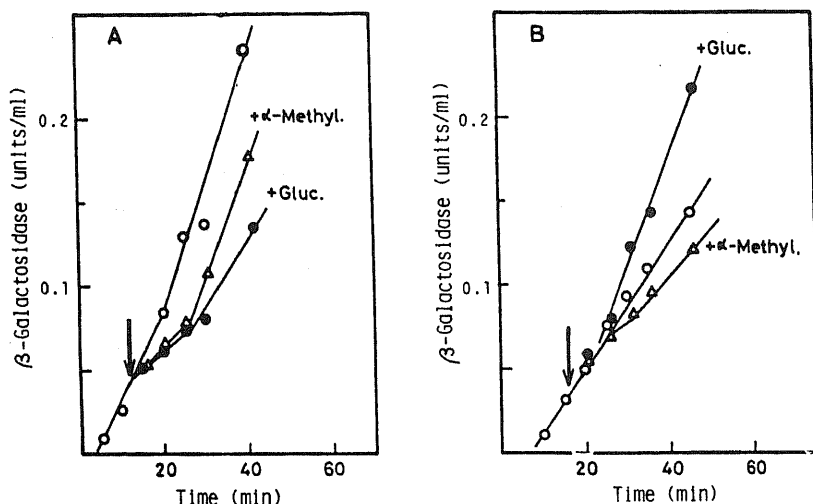


Fig. 1 Effect of glucose and α -methyl-D-glucoside on β -galactosidase synthesis. Cells were grown in TA medium containing xylose, adenine, and thiamine under aerobic [A] and anaerobic conditions [B]. At $t=0$ the culture was induced by an addition of IPTG (a final concentration, 0.4 mM). The induced culture was divided into three portions at 10 min [A] or 15 min [B], one served as control (\circ), a second received 20 mM glucose (\bullet), whereas a third received 100 mM α -methyl-D-glucoside (Δ).

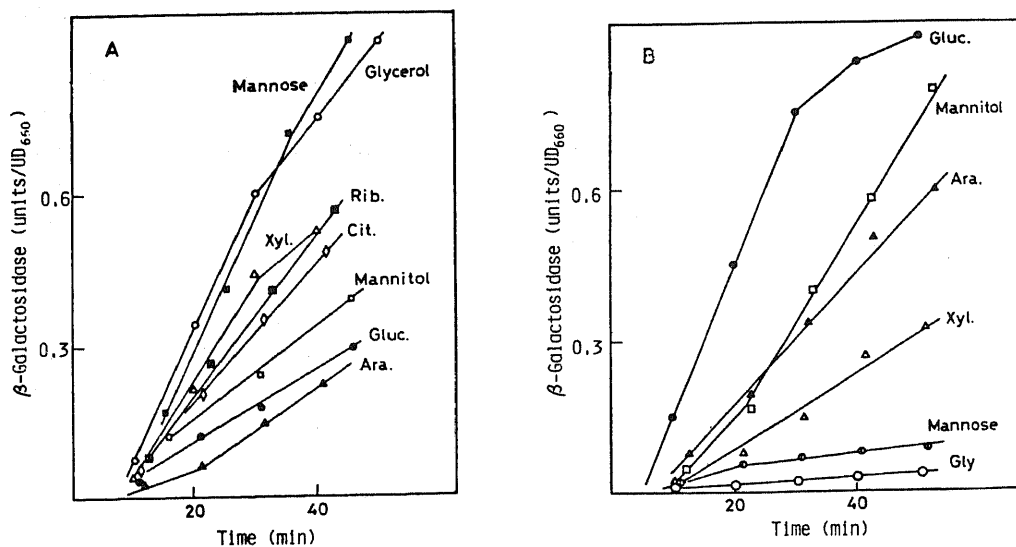


Fig. 2 Effect of carbon sources on the induction of β -galactosidase under aerobic [A] and anaerobic conditions [B].

Cells were grown in TA medium containing thiamine, adenine, and indicated carbon source (a

final concentration of 20 mM). When succinate or pyruvate was used as a sole carbon source under aerobic conditions, the induction curve of β -galactosidase was almost identical with that in the presence of glycerol.

な条件であり、0.75 以上は好氣的な条件で行われたものであるが、この関係は好氣的または嫌氣的条件に起因するものではなく、むしろ増殖速度そのものによるという事は次の諸事実から推定された。

1), クエン酸を炭素源とした好氣的培養条件での β -galactosidase 誘導は増殖速度から推定される値を示す。すなわち好氣的条件でも増殖速度 0.75 以下では β -galactosidase 合成速度は低下する。

2), 非代謝性の glucose 誘導体である α MG は膜透過の際に glucose と競合し、好氣的条件下で一定濃度の glucose を含む培地に種々の濃度の α MG を共存させると増殖速度が低下する。図 4 は、 β -galactosidase 合成速度が増殖速度の低下の小さい時は上昇するが、増殖抑制が強くなると逆に低下する事を示している。これらは図 3 の増殖速度と β -galactosidase 合成速度の関係から推定される傾向と一致する。

3), 嫌氣的条件で単一の炭素源を用いて培養する場合、同時に pyruvate を添加すると増殖速度の増大が認められる。図 5 に示される様に、嫌氣的条件下で glucose と pyruvate を同時に炭素源とすると、増殖速度が増すと共に β -galactosidase 合成速度の著しい低下が見られた。

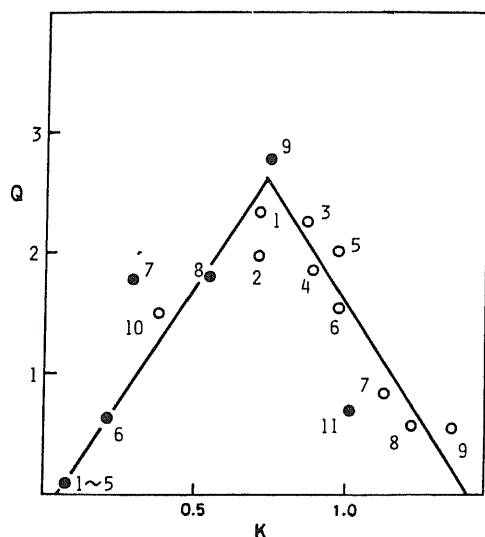


Fig. 3 Relationship between differential rate of β -galactosidase synthesis (Q) and growth rate (K).

An exponential culture of *Escherichia coli* 3000 (adenine⁻) in TA medium containing thiamine, adenine, and carbon source under aerobic (○) or anaerobic conditions (●) was induced with 0.4 mM IPTG. Q and K values were calculated as described in "Material and Method". The numbers indicate carbon source: 1, succinate; 2, pyruvate; 3, glycerol; 4, mannose; 5, ribose; 6, xylose; 7, mannitol; 8, arabinose; 9, glucose; 10, citrate; and 11, glucose + pyruvate.

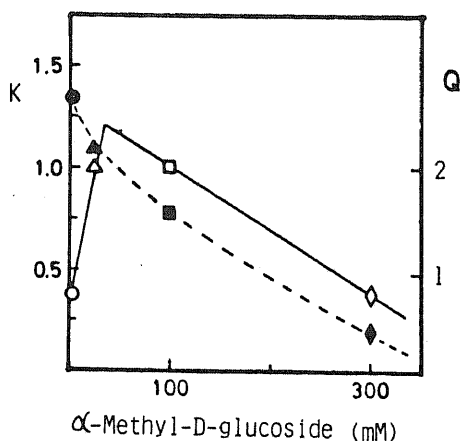


Fig. 4 Effect of α -methyl-D-glucoside on growth rate (K) and differential rate of β -galactosidase synthesis (Q).

Escherichia coli 3000 (adenine⁻) grown in TA medium containing thiamine, adenine, glucose, and indicated concentration of α -methyl-D-glucoside was induced with 0.4 mM IPTG. α -Methyl-D-glucoside: 0 mM (○, ●); 20 mM (△, ▲); 100 mM (□, ■); and 300 mM (◇, ◆). Open and closed symbols represent differential rate of β -galactosidase synthesis (Q) and growth rate (K), respectively.

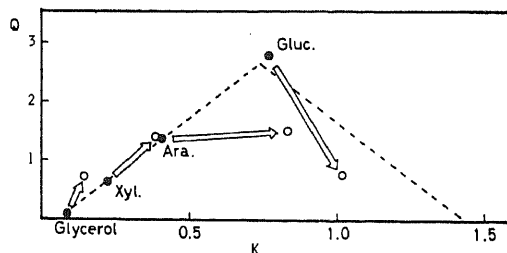


Fig. 5 Effect of addition of pyruvate on differential rate of β -galactosidase synthesis (Q) and growth rate (K) under anaerobic conditions.

Escherichia coli 3000 (adenine⁻) grown anaerobically in TA medium containing thiamine, adenine, and either of glucose, arabinose, xylose, or glycerol in the absence (●) and in the presence of 20 mM pyruvate (○) was induced with 0.4 mM IPTG.

3. β -galactosidase 合成と一般タンパク合成との相互関係.

前記迄の β -galactosidase 合成速度は、一定量の菌体における単位時間の β -galactosidase 合成量で示されている。増殖速度の速い場合一般タンパクの合成も高まっているので、 β -galactosidase 合成速度と一般タンパクの合成速度（単位時間内の濁度の増加量で表わした）との比を各増殖速度に対して示したのが図6である。合成速度の比は増殖速度と逆比例の関係にあり、一般タンパク合成の盛んである程 β -galactosidase の相対的合成速度が低下している。図3に見られた様な増殖速度 0.75 での変曲点に対応する変化は全く見られなかった。

4. β -galactosidase 合成速度に対する cAMP 添加の影響.

Catabolite repression は菌体内 cAMP 濃度の低下に起因すると言われ、従って cAMP の添加で解除される事が知られている³⁾。図7A は 10mM cAMP 存在下での増殖速度と β -galactosidase 合成速度の関係を示している。cAMP の添加による β -galactosidase 合成速度の増加の程度は様々である。好氣的条件下で glucose を炭素源とした場合には約

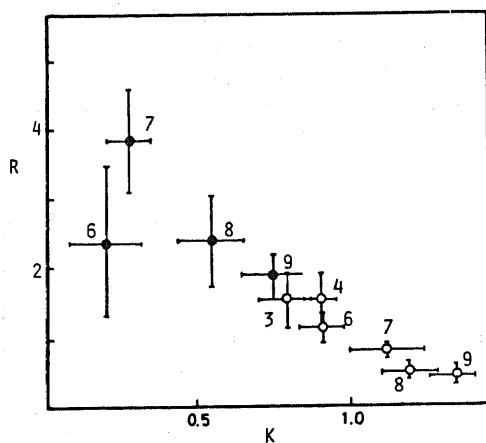


Fig. 6 Relationship between growth rate (K) and ratio of synthetic rate of β -galactosidase to synthetic rate of total protein (R).

R values were obtained by division of the increment in β -galactosidase activity per unit time with the increment in OD_{660} per unit time. Each point represents the mean of six measurements, and bars represent standard deviations. Numbers indicate carbon source, and are identical with those in Fig. 3.

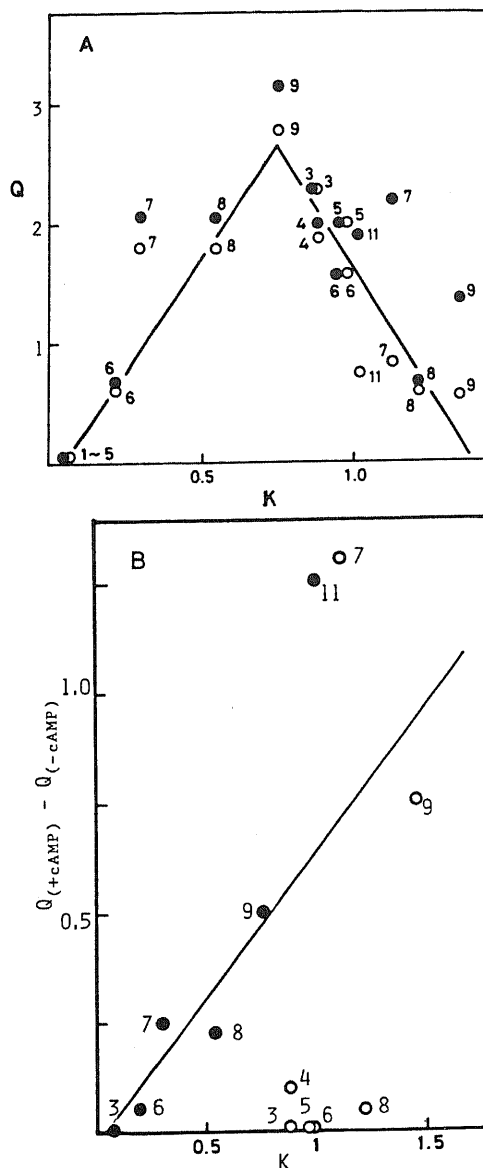


Fig. 7 [A]: Effect of cAMP on β -galactosidase synthesis. Conditions were identical with those described in Fig. 3, except the induction was carried out in the absence (\circ) and in the presence of 10 mM cAMP (\bullet). Numbers indicated are identical with those in Fig. 3.

[B]: Relationship between growth rate (K) and extent of enhancement in β -galactosidase activity due to addition of cAMP.

Values in ordinate are differences between differential rates of β -galactosidase synthesis in the absence and in the presence of 10 mM cAMP. Symbols are as follows: \circ , aerobic; \bullet , anaerobic conditions.

2.5 倍の増加が見られるが、炭素源として glycerol を用いた時の β -galactosidase 合成速度に比べるとかなり低い値である。また好氣的条件下で glycerol, xylose, mannose, arabinose 等を炭素源とした場合には、cAMP 添加による β -galactosidase 合成速度の増加は全くないか極めて小さい。炭素源として arabinose を用いた場合は β -galactosidase 合成速度は非常に低く glucose を用いた時と同じ程度であったが、cAMP の添加による影響は極めて小さかった。

図 7B は、種々の炭素源を用いて cAMP 添加時と無添加時の単位時間の酵素合成量の差と増殖速度の関係を示している。cAMP 添加により酵素合成量の増加が認められる場合は、一般にその増加量は増殖速度の大きいもの程、大きい傾向にある。しかし、数種の炭素源では、cAMP 添加による酵素合成の増加は僅かであり、cAMP の影響は増殖速度よりも炭素源の種類によって決定されていると推定された。

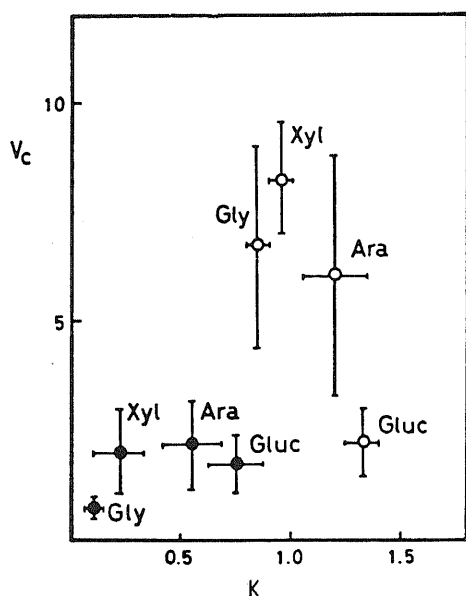


Fig. 8 Relationship between rate of cAMP synthesis (V_c) and growth rate (K).

Cells were grown in TA medium containing ^3H -adenine, thiamine, and either of glucose, arabinose, xylose, or glycerol under aerobic (○) and anaerobic conditions (●). Labelled cAMP appeared in the medium was assayed as described in "Material and Method". Each point represents the mean of four measurements, and bars show standard deviations.

5. 種々の増殖条件下での菌の cAMP 合成能

本研究に用いた大腸菌 3000 の adenine 要求性変異株では、合成された cAMP の大部分は培地中に放出される¹¹⁾。この為、通常の測定法では、各種培養条件による cAMP 合成量の変動は培地中に放出される cAMP 量の変動として反映され、菌体内 cAMP では変動は観察されない。

図 8 は各種条件下での本菌による cAMP 放出量を示している。嫌氣的な条件下では、増殖速度の極めて小さな glycerol の場合を除き、何れの炭素源を用いても cAMP 合成速度に変化はなく、好氣的条件下で glucose を炭素源とした場合と同程度であった。しかし好氣的条件下で glycerol, xylose または arabinose を炭素源とした場合、合成速度は嫌氣的条件の時と比べて数倍に達する。従って cAMP 合成速度は増殖速度に直接関係しないものと思われる。cAMP 合成速度と β -galactosidase 合成の関連についても明確な関係は認められない。glucose を炭素源とした場合、好氣的と嫌氣的条件下で β -galactosidase 合成速度に著しい差があるにも拘らず cAMP 合成速度は大体同じであり、また好氣的条件下で glucose または arabinose を炭素源とした場合、 β -galactosidase 合成速度は同程度であるが、cAMP 合成速度に著しい差が認められた。

考 察

微生物の catabolism に関する酵素の多くが、誘導酵素系に属し repressor を介して negative または positive control を受けている。これらの誘導酵素系の多くは glucose 等の効果的に代謝され得る基質の存在下で酵素合成の抑制、いわゆる catabolite repression の現象が認められ、lactose operon について特に詳細な研究がなされて来た³⁾。その結果 cAMP とその結合タンパクである CRP を介しての positive control の存在が明らかとなり、catabolite repression は細胞内の cAMP 濃度の減少に起因すると解釈された。cAMP の細胞内濃度は細胞外への流出や合成速度の変化によって調節されると思われるが、その機構は未だ明らかでない。この cAMP - CRP 系による調節の存在は確実であるが、これが catabolite repression に対する唯一の機構であるか否かには近年疑問が提出されている。その理由は、ある種の微生物(例えば *B. megaterium*¹⁵⁾)では cAMP 合成能がほとんどないにも拘らず glucose 等による catabolite repression が存在する事。また、ある条件での

repression が cAMP の添加により回復されない事等によるが、更に cAMP の菌体濃度と repression の程度が必ずしも一致せず¹⁰⁾、特に大腸菌の strain の差によって cAMP 濃度あるいは合成速度にかなりの差がある事が報告されている³⁾。

本研究での結果、IPTG による β -galactosidase 合成は増殖速度との関連性が強い。一般に増殖速度の大きい程、全タンパク合成中の β -galactosidase 合成の占める割合が減少する。この減少の機構として部分的に cAMP - CRP 系が関与しているが、培地中に充分量の cAMP を添加してもこの傾向は変わらない事から他の機構の関与が推察される。 β -galactosidase の単位時間内の合成量を見ると、低増殖速度域では全タンパク合成速度が低い為、相対的に β -galactosidase 合成の全タンパク合成に対して占める割合は大きくなっており、 β -galactosidase 合成速度では増殖速度 0.75 前後で最大となっている。

本研究では幅広い増殖速度領域を得る為に嫌気的条件下での培養も行ってきた。嫌気的条件下では catabolite repression が起らない場合のある事は既に知られているが⁹⁾¹⁰⁾、その当時考えられていた様に、「嫌気的条件下が catabolite repression の抑制に必要」というのではなく、一般に嫌気的条件下では増殖速度の低下を伴う事が原因となっている事は、本実験で pyruvate 等の添加で増殖速度を高めると repression の起る事実等より明らかである。

glucose 等による catabolite repression は培地中への cAMP の添加により完全に、または部分的に回復される事はよく知られている³⁾。本研究でも glucose による repression は cAMP の添加によって回復されたが、回復後の β -galactosidase 合成速度は glycerol, succinate 等の炭素源を用いた時に得られる合成速度の 1/2 程度に過ぎない。また arabinose, xylose 等の炭素源を用いた場合は cAMP の添加によって repression はほとんど回復しなかった。この cAMP 添加に対する非感受性は cAMP の細胞膜の非透過性によるものとは考え難い。何故なら、glucose を炭素源とした場合 cAMP 添加濃度を変えて最大回復を示す濃度を調べると約 5mM であるが、実験で用いた濃度はこれ以上であり、また、EDTA 処理¹¹⁾によって cAMP の膜透過性を高めても同様の結果が得られた。更に cAMP 添加に対して非感受性を示した arabinose, xylose, glycerol 等を炭素源とした場合、何れも菌による cAMP 合成速度は非常に高く、cAMP 添加に対する非感受性は cAMP の菌体への充足が十分な為と考えられる。従って arabinose 等を炭

素源とした場合の β -galactosidase 合成の強い抑制は cAMP - CRP 系以外の機構によるものと考えられる。

cAMP 合成速度は培養条件で変動するが、増殖速度との直接的な関連性は認められなかった。glucose を炭素源とした場合、好気的と嫌気的条件下では β -galactosidase 合成に著しい差があるが、cAMP 合成速度に関しては同程度であり、また、glycerol, xylose, arabinose を炭素源として好気的培養を行った場合、cAMP 合成速度が著しく高い等の理由は不可解である。これらは今後の検討に待たねばならない。

上記の結果から、catabolite repression には cAMP - CRP 系以外に非 cAMP の repression 機構が存在する様に思われる。cAMP に対する非感受性の一因として菌体内の CRP 量の低下も考えられる¹⁷⁾が、予備の実験で種々の培養条件での CRP 量を測定した限りでは、何れの条件下でも CRP 量に著しい変化は認められなかった。また、Ullmann 等の Catabolite Modulator Factor⁵⁾の関与の可能性も否定出来ないが、この factor の実態、作用機構も不明であり今後の検討を必要とする。*in vitro* での lactose operon の transcription に関して、transcription の antitermination factor の関与が指摘されている¹⁸⁾が *in vivo* で何の様な役割を果しているか不明である。

本研究で用いた大腸菌 3000 では cAMP - CRP 系と非 cAMP 系 repression の両者の存在が明らかであるが、菌種によりこの両者の関与度は様々である様に思われる。例えば、大腸菌 W2252 では glucose による repression は cAMP によって完全に回復され、非 cAMP 系の repression の関与度はわずかであろうと推定される。従来迄の各報告者による cAMP の repression の回復に及ぼす影響度の差、また、cAMP 合成と β -galactosidase 合成との関連における種々の異なった結果も、部分的にはこの両 repression 系の関与度の差によって説明されると考える。

結 論

大腸菌 3000 の adenine 要求性変異株を用いて、 β -galactosidase 合成における catabolite repression を種々の培養条件で調べた。 β -galactosidase 合成の誘導能は、好気的とか嫌気的という条件よりも菌の増殖速度と密接な関係を持ち、増殖速度 0.75 (1/hr) で最大の速度を示した。しかし、この誘導酵素合成速度の全構成蛋白質合成速度に占める割合は、増殖速度に反比例する傾向を示した。cAMP の添加は、培養条件によって catabolite repression

を部分的にはあるが解除できる場合と殆ど解除できない場合があった。炭素源に glucose や arabinose を用いた時、増殖速度は両者において同程度であるが、cAMP の添加による catabolite repression の解除は glucose を用いた場合のみ観察され、cAMP 添加で catabolite repression が解除され得るか否かは増殖速度よりも炭素源と関係があると思われた。arabinose の他、glycerol や xylose 等を炭素源としても cAMP の添加は catabolite repression を殆ど解除できないが、これらに共通する現象として、この様な培地での培養菌は極めて高い cAMP 合成能を持つ事が示された。

以上から、本菌において観察される catabolite repression には、cAMP を介するものと介さないものの少なくとも 2 種類の機構があると考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました久野滋教授に深く感謝いたします。また、第二生化学教室の皆様の温かい御援助、御協力に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Monod, J. : The phenomenon of enzymatic adaptation. *Growth*, **11**, 223-289 (1947).
- 2) Magasanik, B. : Catabolite - repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 249-256 (1961).
- 3) Pastan, I. & Adha, S. : Cyclic adenosine 5' - monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 527-551 (1976).
- 4) Kung, H-F., Treadwell, B. V., Spears, C., Tai, P. - C. & Weissbach, H. : DNA - directed synthesis *in vitro* of β - galactosidase : Requirement for a ribosome release factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3217-3221 (1977).
- 5) Dessein, A., Tillier, F. & Ullmann A. : Catabolite modulator factor : Physiological properties and *in vitro* effects. *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 89-94 (1978).
- 6) Chantal, G. - R., Danchin, A. & Ullmann, A. : Catabolite repression in *Escherichia coli* mutants lacking cyclic AMP receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 5799-5810 (1980).
- 7) Wanner, B. L., Kodaira, R. & Neidhardt, F. C. : Regulation of lac operon expression : Reappraisal of the theory of catabolite repression. *J. Bacteriol.*, **136**, 947-954 (1978).
- 8) Wright, L. F., Milne, D. P. & Knowles, C. J. : The regulatory effects of growth rate and cyclic AMP levels on carbon catabolism and respiration in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta*, **583**, 73-80 (1979).
- 9) Cohn, M. & Horibata, K. : Physiology of the inhibition by glucose of the induced synthesis of the β - galactosidase - enzyme system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **78**, 624-635 (1959).
- 10) Dobrogosz, W. J. : The influence of nitrate and nitrite reduction on catabolite repression in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **100**, 553-566 (1965).
- 11) 浜井義則 : 大腸菌における cAMP 合成と catabolite repression について : cAMP 合成及び adenine nucleotide の作用. *十全医学会誌*, **87**, 1-9 (1978).
- 12) Kaempfer, R. O. R. & Magasanik, B. : Effect of infection with T - even phage on the inducible synthesis of β - galactosidase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **27**, 453-468 (1967).
- 13) Pardee, A. B., Jacob, F. & Monod, J. : The genetic control and cytoplasmic expression of "inductibility" in the synthesis of β - galactosidase by *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **1**, 165-178 (1959).
- 14) Tyler, B., Loomis, W. F. Jr. & Magasanik, B. : Transient repression of the lac operon. *J. Bacteriol.*, **94**, 2001-2011 (1967).
- 15) Yeung, K. - H., Gillian, C. - L. & Yamazaki, H. : Evidence against the involvement of adenosine 3', 5' - cyclic monophosphate in glucose inhibition of β - galactosidase induction in *Bacillus megaterium*. *Can. J. Biochem.*, **54**, 854-865 (1976).
- 16) Dessein, A., Schwartz, M. & Ullmann, A. : Catabolite repression in *Escherichia coli* mutants lacking cyclic AMP. *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 83-87 (1978).
- 17) Danley, D. E., Drexler, M. & Botsford, J. L. : Differential binding of the cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate receptor protein in

Escherichia coli. J. Bacteriol., **130**, 563 - 565 (1977).

18) Greenblatt, J., Li, J., Adhya, S., Friedman, D. I., Baron, L., Redfield, B., Kung, H. - F. & Weissbach, H. : L factor that is required for β -

galactosidase synthesis is the nusA gene product involved in transcription termination. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **77**, 1991 - 1994 (1980).

Control of β -galactosidase Synthesis in *Escherichia coli*. (Evidence for the Presence of Cyclic AMP-Independent Catabolite Repression). Ayanori Yamakawa, Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920. — J. Jusen Med. Soc., **90**, 132—141 (1981).

Key words: β -galactosidase, catabolite repression, cyclic AMP.

Abstract

Catabolite repression of β -galactosidase synthesis was studied under a variety of growth conditions in *E. coli* 3000 (adenine⁻). The differential rate of induced β -galactosidase synthesis was maximal at the growth rate 0.75 division per hr, irrespective of aerobic and anaerobic growth conditions. However, the proportion of β -galactosidase synthesis in general protein synthesis decreased almost linearly with an increasing growth rate. The addition of cyclic AMP (cAMP) to the medium recovered partly the repressed synthesis of β -galactosidase under some growth conditions, but showed slight or no effect on the enzyme synthesis in a few growth conditions. The effectiveness of the exogenously supplied cAMP appeared to rely on sorts of carbon source in the medium, rather than on growth rate. Thus, although growth rate and β -galactosidase synthesis were similar in glucose- or arabinose-grown cells, the partial elevation in β -galactosidase synthesis upon the addition of cAMP was found only in glucose grown cells. The cells grown in the presence of glycerol, xylose, or arabinose showed a high synthetic rate of cAMP and insensitive to exogenously supplied cAMP in β -galactosidase synthesis. These findings support the idea that catabolite repression found in the strain is caused through two mechanisms, cAMP mediated and cAMP independent. A possible explanation on the latter mechanism is discussed.